

Az endocannabinoid rendszer vizsgálata praeeklampsziában

Doktori tézisek

Dr. Fügedi Gergely

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Molvarec Attila, Ph.D., egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Margittai Éva, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Molnár Andrea, PhD., szakorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Siklósi György, az orvostudomány doktora,
egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Bazsa Sándor, Ph.D., osztályvezető főorvos
Dr. Keltai Katalin, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2015

Bevezetés

A terhesség második felében megjelenő, magas vérnyomás és fehérjevizelés kialakulásával jellemzett praeeclampsia pontos patomechanizmusa a világszerte nagy aktivitással zajló kutatások ellenére napjainkig ismeretlen. A betegség a fejlett országokban az anyai halálozások közel 15%-áért felelős, incidenciája 3-8% körül alakul. A praeeclampsia tünetegyüttesének kialakulása minden esetben a placenta jelenlétéhez kötött, patogenezisét a szakirodalomban elterjedt kétlépcsős praeeclampsia modell írja le: az első lépcső a placenta kóros kialakulása, a második az ebből következő hypoxiás állapot, következményes oxidatív stressz és anyai generalizált endothel diszfunkció, amely a klinikai tünetek megjelenéséhez vezet. A praeeclampsia kialakulását mind genetikai, mind környezeti tényezők befolyásolják, ami multifaktoriális kóreredetre utal.

A placentalis praeeclampsia kialakulásában központi szerepet játszik a decidua spirális artériáinak elégtelen átépülése. A folyamatért felelős extravillózus cytotrophoblastok nem képesek megfelelően betörni a spirális artériák falába, az átépülés a decidua superficialis rétegére limitált, a myometrialis szegmentumok szűkek maradnak. Az ennek következtében kialakuló hypoxia miatt oxidatív stresszben szenvedő placenta kóros mértékben juttat antiangiogén faktorokat és trophoblast eredetű sejttörmelék-aggregátumokat az anyai keringésbe, amelyek a klinikai kórkép kialakulásához vezetnek. A praeeclampsia patogenezisében leginkább kutatott antiangiogén faktor, a szolubilis fms-szerű tirozin kináz-1 (sFlt-1) a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) és placentáris növekedési faktor (PlGF) receptor Flt-1-ből alternatív splicing mechanizmus útján, a transzmembrán és intracelluláris szignalizációs domén elvesztésével keletkező szolubilis fehérje, hatását a VEGF és PlGF faktorok keringésben történő megkötésével fejti ki. Praeeclampsziában a kóros placentalis expresszió következtében emelkedett az sFlt-1 szintje, vele párhuzamosan a proangiogén fehérje VEGF és PlGF szintjei pedig csökkentek; az eltérés a betegségre prediktív értékkel bír, mivel hetekkel a klinikai tünetek megjelenése előtt kimutatható.

Az endocannabinoidok a *Cannabis sativa* (kender) fő komponensével, a Δ^9 -tetrahidrokannabinollal megegyező hatású, endogén termelődő lipid mediátorok. Eddig leginkább ismert és kutatott tagjaik az anandamid (N-arachidonoiletanolamin, AEA) és a 2-arachidonoilglicerol (2-AG). A ligandok hatásukat elsősorban a heptahelikális, G-

fehérje kapcsolt cannabinoid CB1 és CB2 receptorokon keresztül fejtik ki, jellemzően az adenilát-cikláz gátlásán keresztül a cAMP-szint csökkentésével. Lebontásukat az anandamid esetében a zsírsav-amid hidroláz (fatty acid amide hydrolase, FAAH), míg a 2-AG esetében egy specifikus monoacil-glicerol-lipáz (MAGL) végzi. Az endocannabinoidok a szervezet számos fiziológiás és patológiás folyamatához kapcsolódnak, cardiovascularis rendszerre gyakorolt hatásuk elsősorban a vérnyomás és a myocardialis kontraktilitás csökkentésében nyilvánul meg, amelyek elsődlegesen a myocardiumban, érfalakban és központi, valamint autonóm idegrendszerben lokalizált, CB1 receptorok által mediált folyamatok. Hypotenzív hatásuk számos különböző, szövet- és fajspecifikusan eltérő útvonalon érvényesül, és magában foglal CB1 és 1-es típusú vanilloid receptor (TRPV1), valamint nitrogén-monoxid-dependens és -independens mechanizmusokat, illetve eddig nem tisztázott endothelialis útvonalakat is.

Az endocannabinoidok a reprodukciós folyamat szinte minden fontosabb lépésében szerepet játszanak. Emlősökben CB1 és CB2 receptorok jelenlétét azonosították az oocytaérés minden fázisában. Kiemelt szerepet tulajdonítanak az endocannabinoid rendszernek az oviductalis transzportban is: CB1-kiütött egerekben a morula vagy blastocysta hosszabb időre a petevezetékben rekedt, valamint ectopiás terhességen átesett nőkben szignifikánsan alacsonyabb CB1 transzkripciós szinteket mértek. A CB1 receptor aktivációjának decidualizációt gátló hatását mutatták ki humán sejtekben, amely feltehetően cAMP-dependens apoptotikus folyamatokon keresztül érvényesül. Az alacsony lokális anandamid koncentráció növeli az uterus blastocysta iránti receptivitását, míg a magas koncentráció embryotoxikus, csökkent trophoblast proliferációt és sikertelen implantációt eredményez. Az emelkedett 2-AG szint *in vitro* megzavarja a cytotrophoblastok syncytiotrophoblastokká történő funkcionális és morfológiai differenciációját – ez a megfigyelés megerősíti az endocannabinoid rendszer placentatióban betöltött szerepének fontosságát. Korrelációt mutattak ki az anandamid szint és a vajúdas megindulása között: szignifikánsan magasabb plazma anandamid koncentrációt mértek vajúdo nőkben nem vajúdokhoz képest, valamint jelentősen magasabb CB1 expressziót mutattak ki nem vajúdo nőkből vett placentamintákban, vajúdasban levő nők lepenymintáihoz viszonyítva. Eszerint a magas anandamid és alacsony CB1 expresszió feltétele a vajúdas megfelelő időben történő beindulásának.

Célkitűzések

1. Napjainkra bizonyítást nyert, hogy az endocannabinoid rendszer központi szerepet játszik a női reprodukciós folyamatban, ide értve az implantációt, decidualizációt és placentációt. Több tanulmány számolt be a placentaris és perifériás anandamid szintek szoros korrelációjáról spontán vetéléssel és ectopiás terhességgel összefüggésben, emellett felmerült az anandamid vérnyomást szabályozó lehetséges szerepe is. Ezen tapasztalatok alapján tanulmányunkban az anandamid szintek és a praeclampsia közötti összefüggésre kerestünk választ: meghatároztuk egészséges várandós és praeclampsias nők szérum anandamid, sFlt-1 és PlGF koncentrációit. A mért anandamid koncentrációkat emellett összevetettük a vizsgált alanyok praeclampsia szempontjából releváns klinikai paramétereivel.
2. A praeclampsia patogenezisében központi szerepet játszó kóros placentáció az endocannabinoid rendszer lokális szerepének vizsgálatát is indokolja. Ezért a szérum anandamid szintek mellett meghatároztuk az endocannabinoid rendszer további tagjainak, köztük a CB1 és CB2 receptorok, illetve az FAAH enzim expresszióját egészséges és praeclampsias várandósokból vett placenta mintákon.
3. Korábbi tanulmányban leírták az endocannabinoidok lokális hatásának szerepét az uterus receptivitásának és a trophoblastsejtek invazivitásának szabályozásában. A fokozott lokális endocannabinoid aktivitás (magas anandamid szint) a placentáció zavarához, és potenciálisan praeclampsia kialakulásához vezethet. Ez alapján a szöveti expressziók meghatározása mellett a CB1 és CB2 receptorok, illetve az FAAH enzim pontos lokalizációját vizsgáltuk egészséges terhesektől és praeclampsiaiban szenvedő nőktől nyert placenta mintákon.

Beteganyag és módszerek

A tanulmányban részt vevők

A szérumban anandamid, sFlt-1 és PlGF szintek meghatározásához 43 praeclampsziás és 71 egészséges, normál vérnyomásértékekkel rendelkező, szövődménymentes várandósnak vontunk be eset-kontroll vizsgálatunkba. A vizsgálati alanyok kivétel nélkül a Semmelweis Egyetem I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájáról kerültek beválogatásra, kaukázusi rasszhoz tartoztak és Magyarország azonos földrajzi régiójából érkeztek. A praeclampsziás és egészséges várandósokat vérvételkor anyai életkor és terhességi kor szerint illesztettük. Kizáró tényező volt a többes terhesség, krónikus hypertonia, diabetes mellitus, autoimmun betegség, angiopathia, vesebetegség, anyai vagy magzati fertőzés és magzati congenitalis rendellenesség. A mintavétel éhgyomorra történt, az alanyoknál nem indult meg a vajúdás és nem volt észlelhető burokrepedés.

A CB1, CB2 és FAAH expresszió és lokalizáció meghatározásához 18 praeclampsziás és 18 egészséges, normál vérnyomásértékekkel rendelkező, szövődménymentes várandósnak vontunk be az eset-kontroll vizsgálatba, minden más kritérium az előző bekezdésben taglaltakkal megegyező.

A praeclampsia kritériumaként az előzetesen normotenzív nőkben, 20. terhességi hetet követően jelentkező magas vérnyomást (≥ 140 Hgmm szisztolés vagy ≥ 90 Hgmm diasztolés érték kettő vagy több alkalommal, legalább hat óra különbséggel mérve) és proteinuriát ($\geq 0,3$ g/24 óra vagy ≥ 1 keresztes vizelet gyorsesztes eredmény, húgyúti fertőzés hiányában) határoztuk meg. Minden bevont praeclampsziás beteg esetében a vérnyomásérték normál tartományba tért vissza a szülést követő 12. hétig. A praeclampsia súlyos formáját állapítottuk meg a következő értékek jelentkezésekor: ≥ 160 Hgmm-es szisztolés vagy ≥ 110 Hgmm-es diasztolés vérnyomásérték, vagy 5 g/24 óra vagy afeletti értéket elérő proteinuria (vagy ≥ 3 keresztes a gyorsesztesen). A 34. terhességi hetet megelőzően jelentkező praeclampsziát korai kezdetűként kategorizáltuk (20. és 33. terhességi hét közötti megjelenés). Intrauterin növekedési retardációt (IUGR) állapítottunk meg, amennyiben az újszülött születési súlya a magyar születési

súlypercentilis táblázat alapján az adott korra és nemre meghatározott 10 percentilis értéket nem érte el.

A vizsgálati protokollt a Semmelweis Egyetem Regionális és Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága hagyta jóvá, minden vizsgálati alany írásos beleegyező nyilatkozatot írt alá. A tanulmányt a Helsinki Deklarációban foglaltaknak megfelelően végeztük.

Szérumkoncentrációk meghatározása

A vérmintákat alkari vénából, natív csövekbe vettük hozzáadott adalékanyag nélkül, majd szobahőmérsékleten 10 percig 3000 g-vel centrifugáltuk. Az alikvotokat felhasználásig -80 Celsius fokon tároltuk.

A szérum anandamid szinteket nagy teljesítményű folyaddékkromatográfia-tömegspektrometria (high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS) technikával határoztuk meg. A szérum mintából az analitot belső standard (100 ng/ml D₄-anandamid) hozzáadása után acetonitrillel extraháltuk, majd centrifugáltuk. A tiszta felülúszót bepárooltuk N₂ áramban, majd kezdeti eluensben történő visszaoldás után HPLC-MS módszerrel analizáltuk. A kvantitatív meghatározás ismert koncentrációjú anandamidot tartalmazó szérum mintákból nyert kalibrációs görbe segítségével történt (0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100 ng/ml anandamid). A HPLC rendszer egy Jasco kétfázisú pumpából és egy Jasco autosamplerből állt. Az analitikai mérést TSQ Quantum Discovery triple quadrupole tömegspektrométer segítségével végeztük, electrospray ionizációs módszerrel, pozitív ion módban. A kromatográfiás elválasztás Merck Purospher Star C18 oszlopon történt gradiens elúcióval (mobil fázisok: 0,1% hangyasavat tartalmazó 100 mM ammónium-acetát és 0,1% hangyasavat tartalmazó metanol 300 µl/min áramlási sebességgel).

A szérum össz sFlt-1 és biológiailag aktív PIGF szinteket elektrokemilumineszcens immunoassay (Elecsys, Roche, Mannheim, Németország, Cat. No. 05109523 és 05144671) technikával határoztuk meg, Cobas e 411-es analizátoron (Roche, Mannheim, Németország). A szérum sFlt-1 koncentrációjának meghatározása szendvics-elven alapult, a teljes vizsgálat időtartama 18 perc volt. Az első inkubáció során (20 µl-es minta) immunkomplex képződés zajlott le sFlt-1-specifikus

monoklonális biotinilált antitest és ruténium komplexszel jelölt sFlt-1-specifikus monoklonális antitest reakciójával. Ezt követően sztreptavidinnel fedett mikroszemcséket adtunk a mintához, ahol a biotin és a sztreptavidin kötődésével a komplex a szilárd fázishoz rögzült. A reakcióelegyben képződött mágnesezhető mikroszemcséket elektróda fogta be ezután a mérőküvetéből, míg a kötetlen anyagok a ProCell-lel együtt távoztak a rendszerből. Ezt követően az elektródát feszültség alá helyeztük, amely kemilumineszcens fénykibocsátást eredményezett, amely utóbbit fotosokszorozóval mértünk. Az eredmények kalibrációs görbével kerültek meghatározásra, amelyet készülékspecifikusan, kétpontos kalibrációval és reagens vonalkódból leolvasott mestergörbe használatával generált a készülék.

A szérum PIGF koncentráció mérését az előző bekezdésben leírt szendvics-elvhez hasonlóan végeztük, a vizsgálat teljes időtartama 18 perc volt. Az első inkubáció során az 50 µl-es mintában immunkomplex képződött PIGF-specifikus biotinilált monoklonális antitest és a ruténium-komplexszel jelölt PIGF-specifikus monoklonális antitest reakciójával. A vizsgálat további része megegyezik az előző bekezdésben részletezettekkel.

Western blot és immunhisztokémia

A Western blot mérést a chorionlemeztől a basalis lemezig terjedő, teljes vastagságú blokkokon végeztük a teljes placentaris CB1, CB2 és FAAH expresszió meghatározásának céljából. Homogenizátor alkalmazásával 10 ml lizáló pufferben (10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 2 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄, 25 µg/ml PMSF, 2,5 µg/ml Leupeptin, 2,5 µg/ml Aprotinin, 625 µM nátrium-pirofoszfát, 1mM β-glicerofoszfát, 0,1% Triton) 1 g placentaszövetet daráltunk, majd homogenizáltunk háromszor 15 másodpercig. A homogenátumot 800 g-vel 15 percig, 4 Celsius fokon centrifugáltuk, majd a pelletet eltávolítottuk. A felülúszót -80 Celsius fokon tároltuk és négy héten belül felhasználtuk. Az FAAH (AT1983a, egér monoklonális antitest, Abgent Inc., San Diego, Kalifornia, USA), CB1 (EB06945 kecske poliklonális anti-CB1 antitest, Everest Biotech, Upper Heyford, Egyesült Királyság) és CB2 (EB06946 kecske poliklonális anti-CB2 antitest, Everest Biotech, Upper Heyford, Egyesült Királyság)

expressziók humán placentában történő meghatározásához 60 µg-ot használtunk fel a kivont fehérjékből a Western blot analízishez.

A mintákat 100 mM ditiotreitolt tartalmazó 2x Laemmli pufferben készítettük elő és vízfürdőben forraltuk 15 percig. A fehérjét (60 µg) SDS-PAGE (9%) gélen választottuk el, majd nedves transzferrel nitrocellulóz membránra vittük fel 90 percig. A nitrocellulóz membránra történt fehérjetranszfer egyenletességét Ponceau S-sel ellenőriztük. Gyengéd öblítést követően a membránokat szobahőmérsékleten egy órán át blokkoltuk 0,1% Tween 20-at tartalmazó Tris-pufferolt sóoldatban (TBST) oldott 10% (m/V) zsírmentes liofilizált szárított tejben, majd egy éjszakán át inkubáltuk CB1 vagy CB2 vagy FAAH elleni antitesttel. Az antitesteket TBST-ben oldott 1%-os marha szérum albuminnal hígítottuk (CB1 1:1000, CB2 és FAAH 1:500 arányban). Ezt követően a blotokat TBST-ben oldott HRP-konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk 1 órán át szobahőmérsékleten, majd ECL-Western blot detektáló rendszerrel vizualizáltuk (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Egyesült Királyság). A specifikus sávokat a mintákkal párhuzamosan futtatott egér here homogenátummal és színes molekulásúly markerekkel azonosítottuk. A membránt 60 Celsius fokon harminc percig áztattuk stripping pufferben (100 mM 2-merkaptoetanol, 2% SDS és 62,5 mM TRIS-HCl, pH 7,6) a kötött ellenanyag leválasztása végett, majd a membránt MAPK1 antitesttel (1:1000) újrjelöltük és az elsődleges ellenanyaggal mért denzitási értékeket a MAPK1 sáv denzitási értékére normalizáltuk.

A Western blottal kapott denzitási értékeket GELDOC 1.00-UV rendszerrel (Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, USA) kvantifikáltuk. A denzitometriás egységben levő specifikus sávok jeleit ugyanazon membrán megfelelő MAPK1 sáv denzitási jelének értékével korrigáltuk. A CB1, CB2 és FAAH sávok normalizált értékeit a normál placentából nyert értékek százalékában fejeztük ki.

Az immunhisztokémiai (IHC) festést 16 placentamintán végeztük el mindkét vizsgálati csoportból. Az anti-CB1 (GTx100219) és anti-CB2 (GTx101357) nyúl poliklonális antitesteket a GeneTextől (Irvine, Kalifornia, USA), az anti-FAAH (AT1983a) egér monoklonális antitesteket az Abgenttől (San Diego, Kalifornia, USA) szereztük be. A Western blothoz képest történt váltást a CB-antitesteket érintően a régebbi antitestek IHC technológiával való inkompatibilitása indokolta. A placentablokkokból metszett, 3 µm vastag metszeteket SuperFrost Ultra Plus Adhesion

Slides (Thermo Scientific, USA) tárgylemezekre vittük fel, majd 1 órán át 56 Celsius fokon, azt követően 24 órát szobahőmérsékleten szárítottuk felhasználás előtt. Az immunfestést Leica BOND-MAX fully automated IHC & ISH system (Leica Biosystems, St. Louis, Missouri, USA) berendezéssel, Bond Polymer Refine Detection kit (Leica Biosystems) felhasználásával végeztük. Utóbbi tartalmazta a peroxid blokkolót (3% hidrogén-peroxid), poszt-primer polimer penetrációfokozót (Tris-pufferolt sóoldatban és 0,09%-os ProClin™ 950-ben oldott 10% állat szérum), Poly-HRP anti-egér/nyúl IgG polimert (mindkettőt 8 µg/ml hígításban, Tris-pufferolt sóoldatban és 0,09%-os ProClin™ 950-t tartalmazva), DAB Part 1-et (66 mM 3,3'-diaminobenzidin-tetrahidroklorid, stabilizáló oldatban), DAB Part B-t (0,05%-os hidrogén-peroxid, stabilizáló oldatban) és hematoxilint (0,02%). A metszeteket háromszor viasztalanítottuk Bond Dewax Solution (Leica Biosystems) oldattal 72 Celsius fokon, majd alkoholsorban rehidráltuk három lépésben, végül pufferoldatban mostuk (Bond Wash Solution, Leica Biosystems). A CB1, CB2 és FAAH antigén előhívást Leica Bond Epitope Retrieval Solution 2 (pH 9,0) oldattal való 20 perces inkubálással végeztük. Az elsődleges antitesteket Bond Primary Antibody Diluent (Leica Biosystems) oldatban hígítottuk 1:1000 arányban a CB1 és CB2, valamint 1:1200 arányban az FAAH esetében. A metszeteket az előbbi oldatokkal 20 percig inkubáltuk, majd újabb 15 percig a poszt-primer polimerrel. Pufferoldattal és ionmentesített vízzel történő mosást követően peroxid blokkolóval három percig inkubálva blokkoltuk a peroxidáz aktivitást. További pufferoldatos és ionmentesített vízzel történt mosást követően kevert DAB oldatot adtunk a metszetekhez 10 percig, majd ezt követően háromszor mostuk a mintákat ionmentesített vízzel, végül 4 percig inkubáltuk hematoxilinnel. Az előbbieken leírt minden lépés között Leica Wash Solution 10x Concentrate (hígítási arány 1:9) oldattal mostuk a metszeteket. Pozitív kontrollként humán kisagyi szövetet alkalmaztunk.

A metszetekről készült képeket AxioCam Icc 1 kamerával felszerelt Zeiss AxioImager A2 mikroszkóppal (Carl Zeiss Ltd., Thornwood, New York, USA) készítettük, az elkészítéshez AxioVision fényképező és képfeldolgozó szoftvert (4.8.2. verzió, Carl Zeiss Ltd.) alkalmaztunk. A képek 200x-os és 400x-os nagyítás mellett készültek.

Statisztikai analízis

A folyamatos változók eloszlását Shapiro-Wilk-féle W -teszttel határoztuk meg. Tekintettel arra, hogy azok nem mutattak normális eloszlást, nem-paraméteres statisztikai módszereket alkalmaztunk. Két csoport folyamatos változóinak összehasonlítását Mann-Whitney-féle U -teszttel végeztük. A csoportok kategorikus változóinak összefüggését Fisher-féle egzakt és a Pearson-féle χ^2 tesztel vizsgáltuk. A korrelációs koefficiens számításához Spearman-féle rangkorrelációt végeztünk. Mivel a szérum anandamid, sFlt-1 és PIGF értékek nem mutattak normális eloszlást, a kovariancia analízist (ANCOVA) logaritmusosan transzformált adatokkal végeztük.

A statisztikai analízishez az alábbi szoftvereket alkalmaztuk: STATISTICA (11. verzió, StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) és Statistical Package for the Social Sciences (version 22 for Windows; SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Minden statisztikai analízisnél a $p < 0,05$ értéket vettük statisztikailag szignifikánsnak.

Az adatokat folyamatos változók esetében medián (interkvartilis tartomány), a kategorikus változók esetében abszolút szám (százalék) formájában adom meg.

Eredmények

Szérum anandamid szint vizsgálata praeeclampsiaiban

Az anandamid szérumszintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak praeeclampsias betegekben az egészséges várandósokhoz képest (0,75 (0,44-1,03) ng/ml versus 1,30 (0,76-2,0) ng/ml, $p<0,001$). A praeeclampsias terhesek szignifikánsan magasabb sFlt-1 szinttel rendelkeztek (12121 (7963-18316) pg/ml versus 2299 (1393-3179) pg/ml, $p<0,001$) és szignifikánsan alacsonyabb PlGF koncentrációkkal (71,2 (39,2-86,4) pg/ml versus 256,8 (181,1-421,0) pg/ml, $p<0,001$) összevetve az egészséges várandósok értékeivel. Az előbbi értékek közötti eltérés szignifikáns maradt az életkor, vérévételkori terhességi kor, terhesség előtti BMI érték és a primiparák százalékos aránya szerinti illesztést követően is, kovariancia analízis során (ANCOVA).

A praeeclampsias csoportban nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a szérum anandamid szintekben a praeeclampsia enyhe vagy súlyos formája, a betegség korai vagy késői megjelenése, illetve az IUGR megléte vagy hiánya között. A korai kezdetű praeeclampsiasban szenvedő terhesekben mért sFlt-1 koncentrációk szignifikánsan magasabbak voltak a késői megjelenésű betegségűkhöz képest (14606 (12239-24333) pg/ml versus 7971 (5991-12805) pg/ml, $p<0,001$). Ezen felül azon praeeclampsias betegekben, akiknél IUGR jelentkezett (41,1 (28,0-73,2) pg/ml), vagy korai megjelenésű volt a betegségük (41,1 (23,8-68,7) pg/ml), szignifikánsan alacsonyabb PlGF koncentrációkat mértünk, mint azoknál, akiknél nem volt IUGR (77,3 (48,2-93,2) pg/ml, $p<0,05$), vagy késői fellépésű volt a betegség (80,3 (66,0-99,4) pg/ml, $p<0,001$).

Az előzőekben részletezetteken felül Spearman rangkorrelációs koefficiens számításával (folyamatos változók esetében) és Mann-Whitney *U*-teszt (kategorikus változók) elvégzésével vizsgáltuk, hogy a kutatásban részt vevők klinikai jellemzői összefüggésben állnak-e szérum anandamid szintjeikkel. Egészséges várandósokban a mért szérum anandamid koncentrációk szignifikáns pozitív korrelációt mutattak a terhesség előtti BMI értékekkel ($R=0,33$, $p<0,05$). Ennek megfelelően az egészséges várandós csoportban a túlsúlyos és obese alanyok ($BMI\geq 25$ kg/m²) szignifikánsan magasabb szérum anandamid szintekkel rendelkeztek a normális testsúlyúakhoz képest

(1,80 (1,20-2,60) ng/ml versus 1,06 (0,70-1,61) ng/ml, $p < 0,05$). További összefüggést a vizsgálatban részt vevők klinikai jellemzői és a szérumban anandamid szintek között nem találtunk egyik csoportban sem. Ezen felül a szérumban anandamid szintek nem korreláltak a szérumban sFlt-1 és PlGF szintekkel sem az egészséges, sem a praeeclampsziás csoportban.

CB1, CB2 és FAAH expresszió és lokalizáció vizsgálata a placentában

A denzitometria analízis alapján a CB1 placentalis expressziója szignifikánsan magasabb volt praeeclampsziásokban a normotenzív, egészséges várandósokhoz képest (149,3 (105,0-279,7) % versus 98,1 (67,3-131,0) %, $p = 0,008$). Ugyanakkor nem figyeltünk meg szignifikáns eltérést a két vizsgálati csoport placentalis CB2 (105,5 (80,9-133,2) % versus 65,8 (45,5-128,4) %, $p > 0,05$) és FAAH (112,2 (94,7-143,8) % versus 91,2 (63,3-128,4) %, $p > 0,05$) expressziói között.

Erős CB1 immunreakciót észleltünk a syncytiotrophoblast rétegben, valamint az érfa endothelsejtjeiben. Kevésbé intenzív, de pozitív festődést mutatott a decidua, a kapilláris szimazomsejtek, a stromális fibroblasztok és az amnion. Az említett szövetekben a CB1 immunpozitivitás mind normális, mind praeeclampsziás szövetekben megfigyelhető volt, a festődés azonban jelentősen erőteljesebb volt a praeeclampsziás mintákban.

CB2 immunreakciót észleltünk mind a normális, mind a praeeclampsziás placentában, azonban a két csoport között nem találtunk eltérést a festődés intenzitását és lokalizációját illetően. Pozitív reakciót mutattak a syncytiotrophoblastok és stromális fibroblasztok, azonban alacsonyabb intenzitással, mint a CB1 esetében. Az érfa nem, ugyanakkor a deciduában észleltünk CB2 immunreaktivitást. Ezen felül az amnionban foltoszerűen elszórt CB2 immunpozitivitást találtunk.

A CB2 receptorhoz hasonló festődési mintázatot mutatott az FAAH enzim is, ennek megfelelően pozitív reakciót figyeltünk meg a syncytiotrophoblastokban és stromális fibroblasztokban (bár a festődés kevésbé volt intenzív a CB1-hez viszonyítva). Nem találtunk FAAH immunreakciót az érfa nemben, viszont megfigyelhető volt a deciduában, és foltoszerű eloszlásban az amnionban. Az FAAH festődés intenzitása és lokalizációja hasonló volt normális és praeeclampsziás leányban.

Következtetések

1. Vizsgálatunkban csökkent szérumban anandamid szintet mutattunk ki praeeclampsziában, ami az anandamid CB1-et fokozottan expresszáló syncytiotrophoblasthoz történő kötődésének a következménye is lehet. Ismerve az endocannabinoidok gyulladásgátló és vérnyomáscsökkentő hatását, felmerül a csökkent anandamid szint szerepe az anyai szisztémás gyulladásos válaszreakció és vérnyomásemelkedés kialakulásában vagy erősítésében. A szérumban anandamid koncentráció azonban nem mutatott összefüggést az sFlt-1 és PlGF szintekkel, ami arra utal, hogy a keringő anandamid szintek változása és az angiogén egyensúlyzavar független folyamatok praeeclampsziában.
2. Tanulmányunkban szignifikánsan emelkedett CB1 fehérje expressziót figyeltünk meg praeeclampsziás placentaszövetben Western blot technikával, amely eredményeket az immunhisztokémiai vizsgálat is megerősített. A CB1 immunpozitivitás jelentősen erősebb volt a syncytiotrophoblastokban, a boholy mesenchymában, a boholyok capillárisainak endotheljében és simaizomsejtjeiben, valamint a deciduában és az amnionhármban praeeclampsziás mintákban a normál terhességekhez képest. Ugyanakkor nem találtunk szignifikáns eltérést a praeeclampsziás és normál placentaszövetek CB2 és FAAH expressziói és immunreaktivitása között. A megnövekedett CB1 expresszió rendellenes decidualizációhoz és a trophoblast invázió zavarához vezethet, ezáltal szerepet játszhat a praeeclampsia patogenezisében. A praeeclampsziás placentaminták kapilláris endotheljében és az érfal simaizomrétegben megfigyelt magas CB1 immunpozitivitás az endocannabinoidok vazodilatációs hatásának ismeretében lehet a kóros placentációra adott adaptív válasz is, növelve a placenta vérrellátását. Bár a praeeclampsia pontos patogenezise máig ismeretlen, az endocannabinoid rendszer szerepet játszhat a betegség kialakulásában.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. **Fügedi G**, Molnár M, Rigó J Jr, Schönleber J, Kovalszky I, Molvarec A. (2014) Increased placental expression of cannabinoid receptor 1 in preeclampsia: an observational study. BMC Pregnancy Childbirth, 14: 395. (IF: 2,190)
2. Molvarec A, **Fügedi G**, Szabó E, Stenczer B, Walentin S, Rigó J Jr. (2015) Decreased circulating anandamide levels in preeclampsia. Hypertens Res, 38: 413-418. (IF: 2,658)

Az értekezés témájától független közlemények

1. Stenczer B, Molvarec A, Szabó G, Szarka A, **Fügedi G**, Szijártó J, Rigó J Jr. (2012) Circulating levels of thrombospondin-1 are decreased in HELLP syndrome. Thromb Res, 129: 470-473. (IF: 3,133)
2. Toldi G, Vásárhelyi B, Biró E, **Fügedi G**, Rigó J Jr, Molvarec A. (2013) B7 Costimulation and Intracellular Indoleamine-2,3-Dioxygenase Expression in Peripheral Blood of Healthy Pregnant and Pre-Eclamptic Women. Am J Reprod Immunol, 69: 264-271. (IF: 2,668)
3. Molvarec A, Gullai N, Stenczer B, **Fügedi G**, Nagy B, Rigó J Jr. (2013) Comparison of placental growth factor and fetal flow Doppler ultrasonography to identify fetal adverse outcomes in women with hypertensive disorders of pregnancy: an observational study. BMC Pregnancy Childbirth, 13: 161. (IF: 2,152)
4. Gullai N, Stenczer B, Molvarec A, **Fügedi G**, Veresh Z, Nagy B, Rigó J Jr. (2013) Evaluation of a rapid and simple placental growth factor test in hypertensive disorders of pregnancy. Hypertens Res, 36: 457-462. (IF: 2,936)

Összesített impakt faktor: 15,737.